第 43 卷 第 1 期
2000 年 2 月

昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

Vol.43, No.1
Feb., 2000

文章编号：0454-6296（2000）01-0103-04

RAPD 方法用于亚洲玉米螟地理种群分化的研究

孙 姗， 徐茂磊， 王戎疆， 李绍文

（北京大学生命科学学院，北京 100871）

中图分类号：Q966 **文献标识码**：A

玉米螟属鳞翅目（Lepidoptera）螟蛾科（Pyralidae）拟螟亚科（Pyraustinae）杆野螟属（*Ostrinia*），是世界性的重大农业害虫。70 年代以来，通过形态学鉴别、遗传杂交实验和性信息素组份分析及其活性反应等方面的实验表明，在我国绝大部分地区分布的是亚洲玉米螟（*Ostrinia furnacalis*）[1]。80 年代以来，随着分子生物学方法的发展，分子分类学广泛引入了昆虫学领域中，使得人们能够深入地了解昆虫亚种、种群乃至个体等更深层次的遗传分化。其中随机扩增多态性 DNA（Random amplified polymorphic DNA, RAPD）是近些年发展起来的引人注目的一项新技术。本文采用 RAPD 方法研究我国五个地区亚洲玉米螟种群的分化，这将有助于了解我国玉米螟的生物学特性和状况，而且对其防治工作也有重要意义。

1 材料与方法

1.1 亚洲玉米螟的来源

实验用的五个种群分别采自北京（BJ）、黑龙江北安（BA）、陕西杨陵（YL）、浙江杭州（HZ）和云南丽江（LJ）。BJ 与 LJ 的实验用虫分别为实验室人工饲养 F_2、F_3 代幼虫，其余种群皆为在野外玉米秸秆或穗轴中采集的越冬老熟幼虫，BA 种群直接使用幼虫，而 YL 与 HZ 种群是将幼虫饲养至羽化为成虫，所有样品均于 −20℃ 保存。每个种群各测定 3 头，YL 种群中的一个样品在实验过程中被污染，故该种群最后只有两个样品。

1.2 RAPD-PCR

取试虫 1 头，参照 Chapco 等[2]的方法提取 DNA，加无菌重蒸水溶解，并稀释至 40 ng/μL，分装后冷藏备用。PCR 扩增与电泳参照 Williams 等[3]和 Xu 等[4]的方法。随机引物选用美国 Operon 公司生产的 OPW 和 OPF 两个 Kit 共 40 种。

1.3 数据处理

比较同一引物全部个体的扩增结果，具有不同相对迁移距离的条带称作不同的 RAPD 标记（RAPD marker），而相对迁移距离相同的条带则为同一个 RAPD 标记。判读每一个体的全部扩增结果，若存在某一 RAPD 标记，则将其记作 1，若不存在则记作 0；将全部判读结果编成文件，在计算机上用 RAPDPLOT 软件，以下面的公式计算两两样品间的遗传相似度（Similarity, S），得到遗传相似度矩阵：

$$S = 2N_{xy}/(N_x + N_y) \tag{1}$$

其中 N_{xy} 为两个样品共享的 RAPD 标记数，N_x、N_y 分别为 x 样品和 y 样品分别具有的 RAPD 标记数。

用 NEIGHBOR 软件处理矩阵，用 UPGMA 方法[5]构建系统聚类图；用 TREEVIEW 软件根据构建的系

基金项目：国家自然科学基金资助项目（39570106）
收稿日期：1998-05-25；修订日期：1999-01-18

统聚类图文件，绘出系统聚类图。

此外，还采用了 Black IV 等[6]针对 RAPD 条带的特点推荐的另一个公式来计算 Match（M）作为遗传差异的量度：

$$M = N_{AB} / N_T \qquad (2)$$

其中 N_{AB}为两个样品共有的 RAPD 标记数加上共无的标记数，N_T为一个电泳图谱上所有 RAPD 标记的总数。

2 结果与分析

我们所使用的 40 种引物中，除了 OPF17 没有扩增出结果外，其余的 39 个引物均可在 5 个种群的 14 个个体中扩增出数目不等的条带（8 条～28 条，平均 16 条）。纵观全部扩增结果，共计 745 个 RAPD 标记。根据判读照片所得的数据，用公式（1）算出遗传相似度矩阵及遗传距离（$D = 1 - S$）矩阵。种群内个体间平均遗传相似度为 0.6167（0.5028～0.7120），其中 BJ 种群与 LJ 种群内的遗传相似度稍高（0.6897 与 0.6697），可能和它们是实验室饲养的种群有关。不同种群个体之间的平均遗传相似度为 0.4386（0.3382～0.5481），明显小于种群内个体间的平均遗传相似度。

根据遗传距离 D 的数据，用 UPGMA 方法进行聚类，绘出 5 个玉米螟种群的聚类分析图（图 1）。由图 1 可见，各种群内的个体首先聚类。整个系统聚类图分为两枝，一枝包括 BA、BJ 和 YL，从地理分布上看，这三个种群均处于我国北方地区，其中 BJ 和 BA 分化较小，首先聚在一起，然后才和 YL 聚类；另一枝包括 LJ 和 HZ，在地理位置上二者均为南方种群。

用公式（2）计算出 Match，也相应以（$1 - M$）数据做 UPGMA 聚类分析，得到另一个系统聚类图（图 2）。从图 2 可见，和上一个系统聚类图相似，也是种群内个体首先聚类。但是，系统聚类图的结构有所不同，杭州种群不是和丽江种群构成南方一枝，而是先加入到北方一枝中，随后丽江种群加入进去。

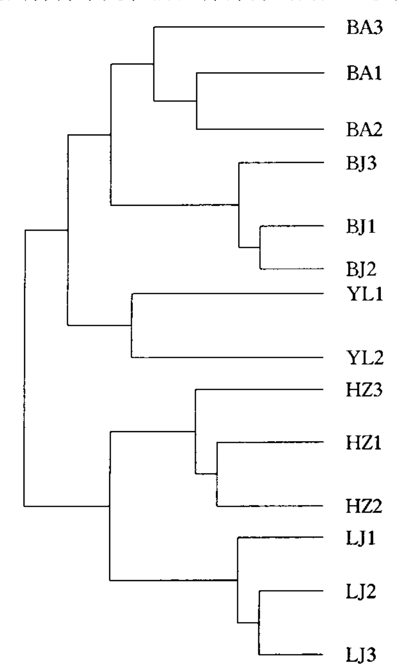


图 1 以遗传距离（$1 - S$）为量度的亚洲玉米螟系统聚类图

Fig. 1 Dendrogram of Asian corn borers based on genetic distance ($1 - S$) measurement

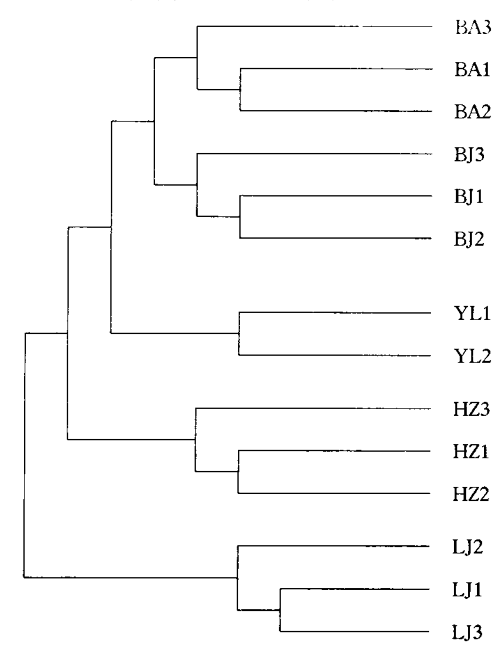


图 2 以（$1 - M$）为量度的亚洲玉米螟系统聚类图

Fig. 2 Dendrogram of Asian corn borers based on ($1 - M$) measurement

3　讨论

一般来说，玉米螟老熟幼虫在高纬度地区也能安全越冬，而且玉米螟雌蛾并不需要经过长距离飞行即可完成卵巢的正常发育，通常认为玉米螟不具备迁飞昆虫的基本特征。但是我国曾在空中和海面上捕到玉米螟，并且在测报工作中屡次发现玉米螟越冬基数与次年第一代发生量不一致，或上下代之间发生数量不相衔接的情况[7, 8]。目前有关玉米螟是否有迁飞的问题尚有争论。

从本实验的结果来看，我国亚洲玉米螟不同地理种群之间已经产生了一定程度的遗传分化。从系统聚类图的结果来看，这种分化是和地理位置有密切关系的。尽管两种方法所得到的系统聚类图有所不同，但都可以得到适当的解释。从公式（1）的系统聚类图来分析，我国亚洲玉米螟是先分为南北两支，然后各支再分化。从公式（2）的系统聚类图来分析，丽江种群最早分支出去，随后杭州种群再分支出去，最后是北方各种群的分化。虽然现在无法定论哪一种方法更准确地反应真实的分化过程，但这种分化和地理位置之间的关系是毋庸置疑的。从现有结果可以看出我国亚洲玉米螟的遗传分化是和地理隔离有很大关系的，因为地理位置上的差异而阻隔了各种群之间的基因交流，从而导致遗传分化。这一结果从分子水平表明亚洲玉米螟可能不具备远程迁飞的能力。

由于只要同源染色体的任一单体可进行 RAPD 扩增，就可在琼脂糖电泳检出一个相应的条带，而只有同源染色体的两个单体都不能进行 RAPD 扩增，在琼脂糖电泳才无法检出相应的条带。因此，若把一个 RAPD 标记看作是一个基因时，这个基因显然是显性的。Black IV 等[6]认为公式（1）只计算了两者共有的显性基因，而忽略了共有的隐性基因，似有不妥。因此建议使用公式（2）来计算，即除了考虑共有标记（显性），同时也应考虑共无标记（隐性），因为相同的隐性基因也是两者的相同之处。这样的考虑显然也是合理的，但某一标记的共无并不意味着两者绝对是相同的隐性基因，也可能是两个不同的基因，尤其是对于亲缘关系越远的样品，这样的问题越严重。尽管 Black IV 将此方法局限于近缘种之内，但仍无法完全避免。从本实验可以看出两种方法的结果是基本一致的，只是 HZ 种群的位置有所不同，但从其地理位置来看，两种结果都可得到适当的解释。在目前研究资料还不是十分丰富的情况下，很难判断哪一个公式更准确。

由于不同的基因具有不同的进化速率，若只用少数的基因来分析两个样品的遗传差异，难免会产生偏差，因此必须要使用一定数量的引物以获得足够的基因用以分析。本实验共使用了 40 个引物，得到 745 个 RAPD 标记。为了判断用多少引物比较合适，我们选用了 1 个、2 个、3 个一直到 10 个引物以及 15 个、20 个、25 个、30 个和 40 个引物的数据分别进行 UPGMA 聚类分析，得到相应的系统聚类图，进行比较。从这些结果来看，用 1～5 个引物的数据所得的系统聚类图个体关系很乱，同一种群的不同个体分散在不同枝系中。用公式（1）计算，当引物达到 10 个的时候，系统聚类图的结构就稳定下来，一直到全部 40 个引物都保持不变。而用公式（2）计算，当引物达到 6 个之后，系统聚类图的结构就稳定了。从我们的实验推想，再考虑到各实验样品的特殊性，可以认为用 20 个引物（一个 Kit）即可获得稳定的系统聚类图。

致谢　本文承北京市农林科学院吴钜文、王素琴和宫云秀等老师的大力支持与协助，在此一并致谢！

参　考　文　献（References）

[1]　全国玉米螟综合防治研究协作组．我国玉米螟优势种的研究．植物保护学报，1988，15（3）：145～151

[2]　Chapco W，Ashton N W，Martel R K B *et al*. A feasibility study if the use of random amplified polymorphic DNA in the population genetics and systematics of grasshoppers. Genome，1992，35：569～574

[3]　Williams J G K，Kubelik A R，Livak K J *et al*. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res.，1990，18（22）：6 531～6 535

[4] Xu M, Sun S, Wang R *et al*. Genetic variation and phylogenetic relationships among six populations of corn borers in China. Biochemical Genetics, 1998, 36 (7/8): 289~297

[5] Nei M. Molecular Evolution Genetics. New York: Columbia University Press. 1987

[6] Black IV W C, DuTeau N M, Puterka G J *et al*. Use of the random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphisms in aphids (Homoptera: Aphididae). Bull. Entomol. Res. , 1992, 82: 151~159

[7] 全国褐稻虱科研协作组. 高山捕虫网在研究稻飞虱迁飞规律和预测中的作用. 昆虫知识, 1981, 19 (9): 241~247

[8] 上海稻纵卷叶螟海捕协作组, 全国稻纵卷叶螟研究协作组. 稻纵卷叶螟迁飞研究. 1981, 24~31

A preliminary study on differentiation among geographical populations of Asian corn borer (*Ostrinia furnacalis*) using RAPD method

SUN Shan, XU Mao-lei, WANG Rong-jiang, LI Shao-wen

(College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871)